

Preparazione del terreno **Sperber solido**

Obiettivo Preparare il terreno Sperber in forma solida per la crescita su piastra di batteri capaci di solubilizzare il fosfato.

Autore Liceo Scientifico Giuseppe Battaglini di Taranto
Secondo classificato Mad for Science 2019
Progetto “Phosphorus for Future”



Materiali e reagenti

- Glucosio in polvere
- Estratto di lievito in polvere
- Cloruro di calcio in polvere (CaCl_2)
- Solfato di magnesio eptaidrato in polvere ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato di calcio in polvere ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- Agar
- Acqua deionizzata
- Spatole
- Navicelle da pesata o carta stagnola
- Becher o beuta graduati da 1L
- Cilindro graduato da 1L
- Ancoretta magnetica
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Scotch da autoclave
- Piastre Petri sterili monouso
- Parafilm®
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Piastra magnetica riscaldante
- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



Tempo

Circa due ore per la preparazione, la sterilizzazione in autoclave e la solidificazione del terreno nelle piastre Petri



Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno Sperber, pesare con una bilancia 10 g di glucosio, 0.5 g di estratto di lievito, 0.1 g di CaCl_2 , 0.25 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2.5 g di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e 15 g di agar, aiutandosi con diverse spatole e una o più navicelle da pesata. Trasferire le polveri in una beuta graduata da 1L.
- 2.** Con un cilindro graduato misurare circa 1L di acqua deionizzata.
- 3.** Trasferire circa 500 ml di acqua deionizzata nella beuta e mescolare la soluzione con una ancoretta su piastra magnetica, riscaldata a 70°C , fino alla completa dissoluzione delle polveri.
- 4.** Portare la soluzione a volume di 1L nella beuta, aggiungendo acqua deionizzata fino a raggiungere la tacca indicatrice corrispondente.
- 5.** Trasferire il terreno Sperber in una bottiglia da 1L resistente al calore, precedentemente marcata con scotch da autoclave con la dicitura "Sperber terreno solido" e la data di preparazione.
- 6.** Sterilizzare il terreno, ponendo la bottiglia in autoclave a 121°C per 15-20 minuti e assicurandosi che il tappo non sia chiuso ermeticamente.
- 7.** Terminata la sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno fino al raggiungimento di una temperatura tale per cui la bottiglia possa essere maneggiata senza scottarsi (circa 50°C).
- 8.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare e pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%.
- 9.** Sotto cappa biologica, preparare le piastre Petri, marcandole con il nome del terreno e la data, e, dopo aver agitato bene il terreno, trasferirne 20-25 ml circa nel centro di una piastra Petri, evitando la formazione di bolle. Distribuire il terreno in maniera uniforme, in modo che il suo spessore in piastra sia all'incirca di 1 cm.
- 10.** Lasciare raffreddare le piastre sotto cappa con il coperchio semichiuso per permettere la solidificazione completa dell'agar.

11. Quando il terreno sarà completamente solidificato, procedere con la semina dei microrganismi, seguendo il protocollo “Isolamento di batteri PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) da suoli agricoli”. In alternativa, chiudere le piastre con il Parafilm® e conservarle a 4°C capovolte e al riparo dalla luce.
12. Liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l’ambiente interno con la luce a raggi UV.

Note

- Il terreno Sperber consente di identificare i batteri in grado di solubilizzare il fosfato, fornito nel terreno come fosfato di calcio, tramite la formazione di un alone chiaro intorno alla colonia.
- La composizione del terreno Sperber è la seguente:
 - Glucosio 10 g/L
 - Estratto di lievito 0.5 g/L
 - Cloruro di calcio 0.1 g/L
 - Solfato di magnesio eptaidratato 0.25 g/L
 - Fosfato di calcio 2.50 g/L
 - Agar 15 g/L
- Le varie polveri sono da acquistare singolarmente, in quanto non esiste in commercio una formulazione completa di terreno Sperber.
- Il terreno ha una colorazione biancastra che diventa trasparente in corrispondenza delle colonie batteriche che solubilizzano il fosfato di calcio.
- Si raccomanda l'utilizzo della piastra magnetica per facilitare e velocizzare la dissoluzione delle polveri. Tuttavia, il fosfato di calcio non entra mai completamente in soluzione: su piastra magnetica sembra dissolversi, ma con la sterilizzazione in autoclave si formano dei depositi marroni sul fondo della bottiglia. Al momento di colare il terreno nelle piastre occorre mescolare il terreno per fare in modo che almeno una parte, seppur piccola, di fosfato di calcio dei residui passi in soluzione. Evitare di staccare i depositi marroni dal fondo della bottiglia per non trasferirli nelle piastre. Anche se dovessero rimanere sul fondo della bottiglia, i sedimenti non costituirebbero un problema, poiché il fosfato è in eccesso nella formulazione del terreno e, dunque, sufficiente per identificare i batteri PSB.
- Questo protocollo può essere realizzato anche in assenza di una cappa biologica a flusso laminare: è sufficiente un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, e la fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino alla quale colare le piastre.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, l'operatore deve adottare alcuni accorgimenti funzionali al mantenimento della sterilità:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria e posizionare il materiale nella porzione centrale del piano;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura, oltre il tempo necessario alla semina e al prelievo del materiale biologico.
- Per mantenere la sterilità delle piastre Petri aprire e chiudere la confezione sotto il flusso della cappa biologica o vicino alla fiamma del becco Bunsen.